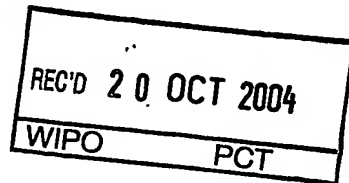


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



PRO/10268

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 43 276.0

Anmeldetag: 18. September 2003

Anmelder/Inhaber: Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena/DE

Bezeichnung: Mehr-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

IPC: G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Stark

Carl Zeiss Jena GmbH
Anwaltsakte: PAT 1250/127

18. September 2003
K/22/br(nh)

Mehr-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

Die Erfindung bezieht sich auf ein Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskop mit einem Anregungsstrahlengang, der ein Objektiv aufweist, das Anregungsstrahlung in einem Fokuspunkt in der Probe bündelt, einer Scan-Einrichtung, die den Fokuspunkt zumindest eindimensional verstellt, und einer Detektoreinrichtung, die in der Probe durch Mehr-Photonen-Anregung stimulierte Lumineszenzstrahlung aufnimmt. Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Verfahren zur Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskopie, bei dem Anregungsstrahlung in einem in einer Probe liegenden Fokuspunkt gebündelt, dadurch in der Probe durch Mehr-Photonen-Anregung Lumineszenzstrahlung stimuliert wird, der Fokuspunkt zum Abscannen der Probe verstellt und die Lumineszenzstrahlung detektiert wird.

Bei herkömmlicher Lumineszenzmikroskopie werden Fluorophore oder Eigenlumineszenzeffekte in einer Probe angeregt. Dazu wird üblicherweise eine gebündelte, auf maximale Lumineszenz abgestimmte Anregungsstrahlung, meist Laserstrahlung, verwendet. Die Anregung erfolgt dabei im Fokusbereich, wobei auch im einfallenden bzw. ausfallenden Lichtkegel des fokussierten Strahlenbündels Lumineszenz stimuliert wird. Zur Bilderzeugung wird die Lumineszenzstrahlung durch eine konfokale Detektion nur aus dem Bereich des Fokus der Anregungsstrahlung aufgenommen. Durch Abrastern einer Probe entsteht ein Bild.

Bei Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskopie wird die Anregungsstrahlung spektral so gewählt, daß mindestens zwei Photonen nötig sind, um eine Anregung zu bewirken. Da die Anregungswahrscheinlichkeit damit stark vermindert ist, kann eine effektive Anregung nur bei einer sehr hohen Flußdichte erfolgen, die nur exakt im Fokus der gebündelten Anregungsstrahlung gegeben ist. Deshalb wird nur im Fokuspunkt eine Emission von Lumineszenz- oder Fluoreszenzstrahlung angeregt. Die bei herkömmlicher Lumineszenzmikroskopie erforderliche konfokale Detektion kann entfallen, da eine Ausblendung von Lumineszenzstrahlung, die außerhalb des Fokus der Anregungsstrahlung emittiert wurde, nicht nötig ist. Die Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskopie arbeitet damit

ohne konfokale Streulichtunterdrückung bei der Detektion. Die verwendeten Detektoren werden als direkte Detektoren bezeichnet. Es wird diesbezüglich auf die Mikroskope der BIO-RAD Microscience, USA, verwiesen. Das im Internet verfügbare Dokument <http://microscopy.bio-rad.com/faqs/multophotone/faqs2.htm> schlägt als direkten Detektor eine auch für die konfokale

5 Mikroskopie übliche Photomultipliereinheit vor, die über einen chromatischen Strahlteiler in den Anregungsstrahlengang eingekoppelt ist und Fluoreszenzstrahlung aufnimmt, die in zur Einstrahlung der Anregungsstrahlung entgegengesetzter Richtung zurückläuft. Der in der Einheit verwendeten Photomultiplieröhre ist eine entsprechende Sammellinse vorgeschaltet, die zusammen mit einer im Anregungsstrahlengang vorhandenen Objektivlinse das Probenfeld

10 auf das relativ kleine Fenster der hochempfindlichen Photomultiplieröhre vollständig abbildet. Da dies für die gesamte Abtastung der Probe erfolgen muß, ist dabei ein gewisser optischer Aufwand unvermeidlich, insbesondere da die zur Abbildung verwendete Objektivlinse auch Teil der Fokussierung des die Mehr-Photonen-Fluoreszenz anregenden Laserstrahls ist. W. Denk et al., „Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy“ in „Handbook of Biological

15 Confocal Microscopy“, Plenum Press, New York, 1995 offenbart, eine Photomultiplieröhre im Durchlichtbetrieb zu verwenden. Auch die 1998 eingereichte DE 198 01 139 sieht dies vor, wobei zusätzlich noch ein Kondensor zum Einsatz kommt, wie er bei BIO-RAD im Auflichtbetrieb verwendet wird.

20 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskop der eingangs genannten Art sowie ein entsprechendes Verfahren zur Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskopie so weiterzubilden, daß die Strahlungsdetektion mit verringertem Aufwand möglich ist.

25 Diese Aufgabe wird mit einem Mikroskop der eingangs genannten Art gelöst, bei dem die Detektoreinrichtung einen Flächendetektor aufweist, der sich auf der dem Objektiv gegenüberliegenden Seite der Probe befindet. Die Aufgabe wird weiter gelöst durch ein Verfahren der eingangs genannten Art, bei dem die Lumineszenzstrahlung auf der der Einstrahlung der Anregungsstrahlung gegenüberliegenden Seite flächenhaft detektiert wird.

30 Erfindungsgemäß wird also ein sogenannter „direkter“ Detektor verwendet, der nun als Flächendetektor ausgebildet ist, der sich auf der dem Objektiv gegenüberliegenden Seite der Probe befindet. Unter Flächendetektor wird dabei jeder Detektor verstanden, dessen Detektorfläche größer ist, als der Lichtweg zur Probe, in der die Lumineszenzstrahlung entsteht.

35 Durch die Anordnung eines solchen Flächendetektors im transmittiven Betrieb ist es zum einen möglich, auf intensitätsmindernde chromatische Strahlteiler zu verzichten. Zum andern kann der Flächendetektor mit äußerst geringem Abstand zur Probe angeordnet werden, so daß er einen großen Raumwinkel bezüglich in der Probe entstandener Lumineszenzstrahlung abdeckt. Der

im transmissiven Betrieb verwendete Flächendetektor empfängt sehr viel mehr Lumineszenz-Strahlungsintensität und erzielt damit ein besseres Signal/Rauschverhältnis; dies insbesondere auch, weil keine Verluste durch zwischengeschaltete, auch zur Einstrahlung der Anregungsstrahlung verwendete Optiken, wie Abbildungsoptiken oder dichroitische Strahlteiler, erfolgen. Die Detektion der Lumineszenzstrahlung muß nicht mehr durch das Objektiv des Anregungsstrahlengangs erfolgen.

Um einen möglichst großen Raumwinkel abzudecken, ist es vorteilhaft, daß der Flächendetektor in einem Abstand zum Fokuspunkt liegt, der sehr viel kleiner als die Ausdehnung des Flächendetektors ist, beispielsweise nur ein Zehntel davon beträgt.

Bei vielen Detektoren mit einem flächig ausgedehnten Detektionsbereich ist es vorteilhaft, die Strahlung möglichst senkrecht zum flächenhaften Detektionsbereich einfallen zu lassen, da dann die Nachweiswahrscheinlichkeit maximal ist. Es ist deshalb zur Signalhomogenisierung bevorzugt, zwischen Flächendetektor und Probe ein optisches Element anzuordnen, das in der Probe entstehende Lumineszenzstrahlung auf den Flächendetektor richtet. Es dient insbesondere nicht zur Einbringung der Anregungsstrahlung. Das optische Element kann in einer besonders einfachen Ausführungsform als Gitter ausgebildet werden, vorzugsweise als holographisches Gitter.

In einer besonders einfach zu realisierenden Bauweise kann ein solches optisches Element auch direkt auf der Unterseite eines Probenträgers, der im Lumineszenz-Mikroskop verwendet wird, angebracht werden.

Bei der Lumineszenzmikroskopie ist es möglich, biologische Proben anhand ihres Eigenlumineszenzspektrums zu identifizieren. Auch dieses Vorgehen ist im erfindungsgemäßen Lumineszenzmikroskop möglich, wenn ein ortsauflösender Flächendetektor verwendet und zwischen Flächendetektor und Probe ein Spektralanalysator geschaltet wird, der von der Probe ausgehende Strahlung spektral zerlegt. In einer sehr einfachen Gestaltung wird zur spektralen Zerlegung das bereits erwähnte Gitter zwischen Probe und Flächendetektor angeordnet. Das Gitter oder der Flächendetektor ist dazu mit einer geeigneten Mechanik gekoppelt, die eine ein- oder zweidimensionale Querverschiebung (bezogen auf die flächenhafte Ausbildung des zu untersuchenden Präparats) vornimmt. Ein Verschieben des Gitters oder des Flächendetektors bewirkt eine Verschiebung des vom Eigenlumineszenzspektrum abhängigen Interferenzmusters und erlaubt so eine Probenidentifikation. Alternativ oder zusätzlich kann das Signal/Rauschverhältnis gesteigert werden, wenn eine bekannte spektrale Verteilung gesucht wird.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beispielshalber noch näher erläutert. In den Zeichnungen zeigt:

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Ausschnitts eines Mikroskops zur Mehr-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie und

Fig. 2 eine schematische Darstellung des eine Mehr-Photonen-Fluoreszenz anregenden Laserstrahls.

10 In Fig. 1 ist schematisch ein Mikroskop M dargestellt, das Mehr-Photonen-Fluoreszenz- oder Lumineszenzmikroskopie erlaubt. Dabei ist in Fig. 1 nur der Bereich des Mikroskops, in dem sich die Probe befindet, dargestellt.

15 Das Mikroskop M weist eine (nicht dargestellte) Strahlquelle auf, die einen Laserstrahl 1 mit einer Wellenlänge um 700 nm abgibt. Der Laserstrahl 1 fällt durch ein Objektiv 2, das einen fokussierten Strahl 3 abgibt. Der Fokus 4 liegt dabei in einer Probe 5, die sich unter dem Objektiv 2 hinter einem Deckglas 6 auf einem Probenträger 7 befindet.

20 Der derart in die Probe 5 fokussierte Laserstrahl 1 bewirkt, wie in Fig. 2 dargestellt ist, eine Mehr-Photonen-Anregung in der Probe 5. Dabei kann entweder eine Eigenfluoreszenz des biologischen Materials der Probe 5 oder eine Fluoreszenz speziell in der Probe 5 vorgesehener Fluorophore angeregt werden. Der durch das in Fig. 2 nur schematisch gezeichnete Objektiv 2 in einer Strahltaile T fokussierte Laserstrahl 1 erreicht lediglich im Bereich des Fokus 4 eine Strahldichte, die zur Anregung von Mehr-Photonen-Fluoreszenz ausreicht. Außerhalb der
25 Strahltaile T kann keine Mehr-Photonen-Fluoreszenz mit ausreichender Wahrscheinlichkeit angeregt werden. Es entsteht deshalb lediglich im Bereich des Fokus 4 Fluoreszenzstrahlung. An anderen Stellen im fokussierten Strahl 3 tritt keine Fluoreszenz auf.

30 Beim Mikroskop M kann also davon ausgegangen werden, daß Fluoreszenzstrahlung ausschließlich aus dem Fokus 4 stammt. Eine ortsauflösende Detektion der Fluoreszenzstrahlung ist deshalb nicht erforderlich. Um die homogen im Fokus 4 abgestrahlte Fluoreszenzstrahlung möglichst vollständig aufnehmen zu können, ist unter dem Probenträger 7 ein Gitter 8 angeordnet, das innerhalb eines Strahlkegels K ausgehende Strahlung so auf einen CCD-Sensor 9 umleitet, daß die Strahlung möglichst senkrecht auf den Sensor 9 fällt.

35

Das optionale Gitter befindet sich in einem sehr geringen Abstand d unterhalb des Fokus 4, so daß in Kombination mit der vergleichsweise großen Ausdehnung des in der Fig. 1 nur als

Schnittdarstellung dargestellten Sensors 9 ein sehr großer Raumwinkel bezogen auf den Fokus 4 abdeckt, ist.

Da die Darstellung in Fig. 1 bezüglich der Dicken der Probe 5, des Probenträgers 7 und des Gitters 8, insbesondere bezüglich des Abstandes d, nicht maßgeblich, sondern stark vergrößert ist, sammelt die den Flächendetektor verkörpernde Einheit aus Gitter 8 und Sensor 9 nahezu alle in einen Halbraum emittierte Fluoreszenzstrahlung auf. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist dadurch stark verbessert.

Der CCD-Sensor 9, der im vorliegenden Beispiel als back illuminated CCD-Sensor ausgebildet ist, liefert die entsprechende Bildinformation an ein Steuergerät 10. Dieses führt die Signalauswertung durch.

Zur Ausblendung der auch auf die Detektoreinheit gerichteten Anregungsstrahlung 1 können verschiedene Ansätze verwendet werden. Zum einen kann ein Sensor 9 zum Einsatz kommen, der bezüglich der Anregungsstrahlung nicht empfindlich ist. Zum andern kann bei der Verwendung einer gepulsten Anregungsstrahlung die Auslesung des Sensors 9 auf Zeiträume beschränkt werden, in denen keine Anregungsstrahlung 1 emittiert wird. Auch ist es möglich, den relativ kleinen Bereich des flächenhaften Detektors, in dem Anregungsstrahlung auf den Sensor 9 fällt, auszublenden. Dazu kann entweder ein ortsauflösender Detektor dienen, der im betroffenen Bereich nicht ausgelesen wird, oder es wird dem Sensor 9 eine geeignete (gegebenenfalls verstellbare) Blendeneinrichtung vorgeschaltet. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung eines geeigneten Filters oder dichroitischen Reflektors dar, der die Anregungsstrahlung vom Detektor fernhält. Diese Möglichkeiten zum Unterdrücken der Anregungsstrahlung durch zeitliches oder örtliches Ausblenden können natürlich allein oder in beliebiger Kombination zum Einsatz kommen.

Im vorliegenden Ausführungsbeispiel ist an der Unterseite des Probenträgers 7 und/oder am Gitter 8 ein Filter für Anregungsstrahlung angebracht. Es handelt sich dabei um ein Infrarotsperrefilter, das bei 700 nm sperrt.

Eine weitere Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses bzw. eine weitere Informationsgewinnung ist möglich, wenn das Gitter 8 eine spektrale Zerlegung der in den Strahlkegel K eintretenden Fluoreszenzstrahlung vornimmt. Das Steuergerät 10 liest dazu den (ortsauflösend detektierenden) Sensor 9 geeignet aus und identifiziert eine Probe 5 anhand deren Eigenfluoreszenzspektrum. Die spektrale Aktivität des Gitters 8 erschließt weiter eine zusätzliche, spektrale Möglichkeit, die Anregungsstrahlung 1 auszublenden, da sie sich spektral deutlich von der Fluoreszenzstrahlung unterscheidet.

In der Regel wird das Gitter 8 ein Interferenzmuster auf dem Sensor 9 erzeugen. Zur spektralen Analyse ist es in einer Ausführungsform vorgesehen, daß das Steuergerät 10 eine Relativverschiebung von Gitter 8 und Sensor 9 bewirkt, so daß sich das Interferenzmuster, welches die spektrale Zusammensetzung der in den Strahlkegel K eintretenden Fluoreszenzstrahlung (gegebenenfalls zusammen mit Anregungsstrahlung 1) anzeigt, ändert. Die Änderung ermöglicht dann dem Steuergerät 10 über bekannte Algorithmen eine Aussage über die spektrale Zusammensetzung der Fluoreszenzstrahlung aus dem Fokus 4.

10 Um einen möglichst großen Raumwinkel zu erreichen sollte der Abstand d natürlich so gering wie möglich sein. In einer weiteren (nicht in Fig. 1 dargestellten) Ausführungsform ist deshalb das Gitter 8 direkt auf der Unterseite des Probenträgers 7 angebracht. Ohne Gitter 8 sollte der Abstand d (nun zwischen Fokus 4 und Sensor 9) minimiert werden, indem der Sensor möglichst nah am Probenträger 7 liegt.

15

Patentanwälte
GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.)
European Patent and Trademark Attorneys
MÜNCHEN – JENA

Büro München / Munich Offices:
Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (0 89) 5 46 15 20 · Telefax: (0 89) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / Jena Offices:
Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (036 41) 2 91 50 · Telefax: (036 41) 2 91 52 1 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

Carl Zeiss Jena GmbH
Anwaltsakte: PAT 1250/127

18. September 2003
K/22/br(nh)

Patentansprüche

5
1. Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskop (M) mit einem Anregungsstrahlengang, der ein
Objektiv (2) aufweist, das Anregungsstrahlung (1) in einem Fokuspunkt (4) in der Probe (5)
bündelt, einer Scan-Einrichtung, die den Fokuspunkt (4) zumindest eindimensional verstellt und
einer Detektoreinrichtung, die in der Probe durch Mehr-Photonen-Anregung stimulierte
Lumineszenzstrahlung aufnimmt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Detektoreinrichtung einen
Flächendetektor (9) aufweist, der sich auf der dem Objektiv (2) gegenüberliegenden Seite der
10 Probe (5) befindet.

15
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Flächendetektor (9) in
einem Abstand (d) zum Fokuspunkt (4) liegt, der klein gegen die Ausdehnung (b) des
Flächendetektors (9) ist, um einen möglichst großen Raumwinkel (K) abzudecken.

3. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen
Flächendetektor (9) und Probe (5) ein, vorzugsweise holographisches, Gitter (8) angeordnet ist.

20
4. Mikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gitter (8) auf der
Unterseite eines Probenträgers (7) aufgebracht ist.

5. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch einen
ortsauflösenden Flächendetektor (9).

25
6. Mikroskop nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch einen CCD-Flächendetektor (9),
vorzugsweise als rückseitenbeleuchteter CCD-Sensor.

30
7. Verfahren zur Mehr-Photonen-Lumineszenzmikroskopie, bei dem Anregungsstrahlung (1)
in einem in einer Probe (5) liegenden Fokuspunkt (4) gebündelt, dadurch in der Probe (5) durch
Mehr-Photonenanregung Lumineszenzstrahlung stimuliert wird, der Fokuspunkt (4) zum

Abscannen der Probe (5) verstellt und die Lumineszenzstrahlung detektiert wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lumineszenzstrahlung auf der der Einstrahlung der Anregungsstrahlung gegenüberliegenden Seite flächenhaft detektiert wird.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Detektion eine spektrale Zerlegung der Lumineszenzstrahlung erfolgt.

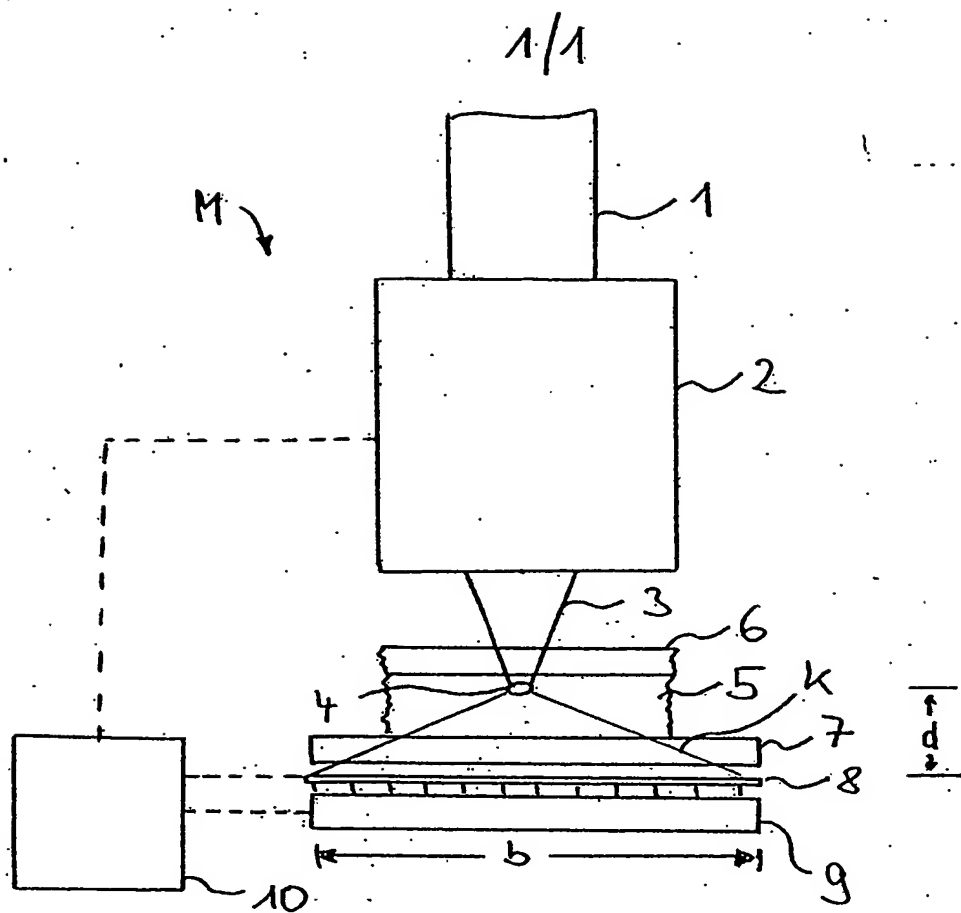


Fig. 1.

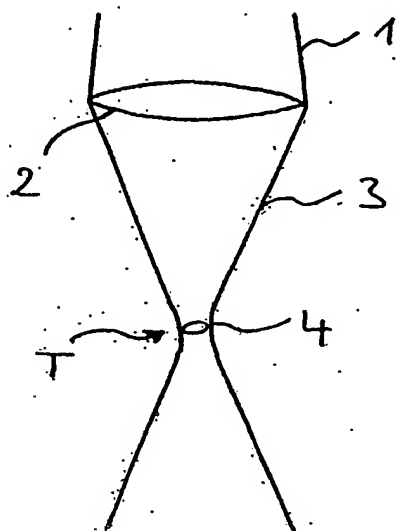


Fig. 2.

BEST AVAILABLE COPY

Patentanwälte
GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.)

European Patent and Trademark Attorneys

MÜNCHEN – JENA

Büro München / Munich Offices:

Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (089) 5 46 15 20 · Telefax: (089) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / Jena Offices:

Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (036 41) 2 91 50 · Telefax: (036 41) 29 15 21 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

Carl Zeiss Jena GmbH
Anwaltsakte: PAT 1250/127

18. September 2003
K/22/br(nh)

Zusammenfassung

Es wird beschrieben ein Mehr-Photonen-Fluoreszenzmikroskop (M) mit einem
5 Anregungsstrahlengang, der ein Objektiv (2) aufweist, das Anregungsstrahlung (1) in einem
Fokuspunkt (4) in der Probe (5) bündelt, einer Scan-Einrichtung, die den Fokuspunkt (4)
zumindest eindimensional verstellt und einer Detektoreinrichtung, die in der Probe durch Mehr-
Photonen-Anregung stimulierte Fluoreszenzstrahlung aufnimmt, wobei die Detektoreinrichtung
einen Flächendetektor (9) aufweist, der sich auf der dem Objektiv (2) gegenüberliegenden Seite
10 der Probe (5) befindet.

Fig. 1